EXTRAIT DU BULLETIN DE LA SOCIÉTÉ LINNÉENNE DE NORMANDIE.
Volume 102. — Année 1971, p. 71.

Printed in France.

EFFETS D'UN AGENT RADIOMIMÉTIQUE (PROCARBAZINE) SUR LA CINÉTIQUE DE CROISSANCE D'*AZOTOBACTER CHROOCOCCUM* INTERACTIONS CELLULAIRES ET RÉSISTANCE AU MILIEU,

par J. GOUSSARD (*).

I — Introduction.

Le développement de la recherche cancérologique depuis ces quinze dernières années a permi non seulement de progresser très rapidement dans la connaissance de processus spécifiquement néoplasiques, mais a apporté également une importante contribution à la connaissance de certains processus biologiques fondamentaux au niveau de la cellule.

Ainsi, l'étude des effets des radiations ionisantes sur les cellules a permi de mettre en évidence de nouveaux systèmes enzymatiques, inconnus il y a seulement quelques années, qui réparent spécifiquement les lésions des chaînes de DNA, aussi bien dans les cellules de métazoaires que chez les bactéries. Avec les agents chimiques carcinostatiques ont été précisés des processus de perméabilité cellulaire liés à la présence d'enzymes spécifiques (perméases), et mis en évidence des chaînes particulières de biodégradation intracellulaire.

Par ailleurs, c'est encore à partir de la cancérologie et des cultures de tissus qu'ont été étudiées les différentes phases du cycle cellulaire et leur sensibilité spécifique vis-à-vis des agents cytotoxiques.

Il y a dans la littérature de nombreux faits qui mettent en évidence que les propriétés individuelles des cellules se modifient lorsqu'elles sont groupées en amas ou en population, rendant par conséquent difficile l'extrapolation *in vivo* de résultats obtenus *in vitro* à

(*) Laboratoire de Physiologie bactérienne, Université de Caen. Laboratoire de Biologie cellulaire, Centre F. Baclesse, Caen.

Cet article constitue l'article principal d'une thèse de Doctorat d'Etat (Sciences Naturelles) qui porte le n° A.O. 6440 à l'enregistrement du Centre National de la Recherche Scientifique.

Ce travail a été réalisé avec l'aide du Comité du Calvados de la Ligue Française contre le Cancer.

partir de cellules isolées, et nous avons constaté au cours de travaux préliminaires qu'une cellule donnée, isolée d'une part et groupée en population d'autre part, peut avoir un comportement physiologique totalement différent vis-à-vis d'un même milieu biologique extérieur.

Pour préciser ce phénomène, appelé par certains « effet de population » (12), nous avons entrepris une étude *in vitro* sur le comportement *individuel* et *collectif* d'une souche cellulaire soumise aux effets d'un milieu de culture cytotoxique, notre but étant de faire la part des propriétés qui paraissent être spécifiquement cellulaires et des propriétés qui sont plus précisément la résultante d'interactions particulières, s'exerçant entre les cellules au sein des populations.

Par ailleurs, l'action d'un agent cytotoxique sur une population a pour effet de faire ressortir une certaine hétérogénéité parmi les individus, les plus sensibles étant susceptibles de proliférer normalement sur milieu optimum mais étant les premiers atteints par l'agent inhibiteur. Nous avons mis en évidence et étudié cette hétérogénéité en faisant agir la procarbazine, drogue carcinostatique dont l'étude *in vitro* a été assez peu développée, ayant été testée essentiellement sur des tumeurs animales et humaines.

Enfin, le choix d'une population bactérienne (*Azotobacter chroococcum*) pour ce travail a été guidé par des raisons de commodité pratique compte tenu des similitudes de plus en plus évidentes qui existent au niveau intracellulaire entre les bactéries et les cellules métazoaires.

Après un bref rappel des principales propriétés de la procarbazine, on envisagera successivement son action sur la cinétique de croissance d'une population cellulaire bactérienne, puis sur la survie de cellules isolées, en tentant de préciser la nature des intéractions cellulaires mises en évidence, et leur rôle biologique dans la croissance des populations.

II — Propriétés de la procarbazine (M.I.H.) (*).

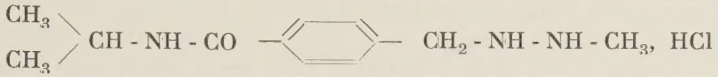
C'est au cours de recherches sur les inhibiteurs de la monoamine oxydase que Bollag et Grunberg [3] mirent en évidence les propriétés antitumorales d'une série de substances possédant en commun dans leur molécule le radical méthylhydrazine. Le premier produit à activité carcinostatique isolé fut le 1-méthyl-2-benzylhydrazine, mais il présentait, en plus de son activité antitumorale, une nette toxicité pour le foie et son étude ne fut pas poursuivie. A la suite de cette découverte Zeller [28] synthétisa toute une série d'hydrazines dans le but d'isoler un produit ayant une bonne activité carcinostatique associée à une basse toxicité, et c'est après l'analyse de plusieurs centaines de composés que fut isolée et étudiée la procarbazine, ou 1-méthyl-2p-(isopropyl-

(*) Cette substance nous a été gracieusement fournie par les Laboratoires Roche (Paris) que nous remercions vivement

UNIV. LEIDEN BIBL.

carbamoyl)-benzylhydrazine, commercialisée par les laboratoires Hoffmann-La-Roche (Bâle) sous le nom de Natulan.

Procarbazine



Chlorhydrate de 1-méthyl-2p-(isopropylcarbamoyl)-benzylhydrazine.
(ou : ibenzmethyzin ; Ro 4.6467/1 ; NSC 77213).
Le symbole MIH sera utilisé dans la suite du texte.

A — Propriétés radiomimétiques et alkylantes de la MIH.

Les propriétés de cette drogue ont été étudiées essentiellement chez l'animal et la littérature fait état de très peu de travaux *in vitro*. Dans le cas de la tumeur ascitique d'Ehrlich chez la souris, la MIH réduit de 63 % l'index mitotique des cellules dans les heures qui suivent l'injection et l'examen des structures nucléaires révèle des ruptures et des recombinaisons anormales de chromatides (24) mettant en évidence la polarité particulière de cette drogue pour le DNA ; par ailleurs, on observe par autoradiographie une inhibition d'incorporation de thymidine dans le DNA.

On a constaté très vite que le processus de segmentation du DNA dépendait de l'état d'oxygénation du milieu, l'oxygène favorisant la dégradation, l'anoxie ou l'action d'enzymes telles que les péroxydases ou les catalases inhibant l'action de la MIH [1], et la détection rapide de catabolites dans le milieu extra-cellulaire permit d'établir un rapport entre la cytotoxicité de la drogue et sa vitesse de dégradation oxydative. Il a été montré depuis que cette dégradation de la drogue conduit à la production de radicaux OH· et d'eau oxygénée [22, 26], ces produits apparaissant également lors de l'action des radiations ionisantes sur les milieux biologiques. C'est en cela essentiellement que cette drogue peut être qualifiée de radiomimétique, car les autres propriétés citées : inhibition des mitoses, rupture du DNA, sont communes aux radiations et à beaucoup d'autres drogues, parmi lesquelles il faut citer les agents alkylants.

Le radical méthyle fixé sur la fonction hydrazine de la molécule semble être assez instable et il peut être incorporé à l'adénine, à la guanine des chaines de DNA et de RNA, voire même à des protéines cellulaires [4], ces alkylations entraînant une inhibition parfois totale de la synthèse protéique [19].

Il y a évidemment une grande similitude d'action entre la MIH et les radiations ionisantes dans la mesure où ces deux types d'agents ont en commun les propriétés suivantes : libération dans le milieu de radicaux oxydants, rupture des chaînes de DNA, alkylations moléculaires, inhibition de la mitose et des biosynthèses intracellulaires.

B — Effets sur la croissance tumorale.

Ce sont les expériences réalisées sur le carcinome solide d'Ehrlich, le carcinome ascitique d'Ehrlich, le sarcome 180 de Crocker, le carci-

nome 256 de Walker et l'épithélioma T8 de Guérin qui ont révélé les propriétés carcinostatiques de la MIH, qui dans tous les cas cités inhibe considérablement la croissance tumorale [13].

Comme pour toutes les substances utilisées en chimiothérapie anticancéreuse l'action du produit ne se limite pas aux cellules tumorales et, si la tumeur P 815 et la leucémie L 1210 de la souris sont traitées efficacement, on observe en même temps une atteinte de tous les tissus à prolifération rapide : sang, épithélium intestinal, tissu germinal mâle [3].

C — Autres propriétés.

Comme beaucoup de substances agissant sur le DNA il faut s'attendre à observer un effet paradoxal allant contre l'effet carcinostatique espéré. Beaucoup de ces drogues sont en effet susceptibles de provoquer la cancérisation, et dans le cas de la MIH on a obtenu des adénocarcinomes mammaires chez la souris, et des effets tératogènes sur des fœtus de rats [5].

Enfin, cette action dégradative sur le DNA a un retentissement cellulaire général entraînant une inhibition de la glycolyse et une déficience en NAD [7], une inhibition de la monoamine oxydase [25] et d'autres enzymes associées au cycle oxydatif de Krebs.

III — Effets de la MIH sur la cinétique de croissance d'*Azotobacter chroococcum*.

A — Matériel — Techniques.

Pour pouvoir étudier les effets de la MIH sur la croissance d'une population, nous avons utilisé une souche bactérienne dont la croissance relativement lente puisse permettre de réaliser de nombreux tests à différents stades. *Azotobacter chroococcum* a été choisi en raison de sa durée de croissance qui s'étale sur une période de 7 à 8 jours, temps comparable à celui de la croissance de cellules de rein de porc par exemple. C'est une bactérie de taille assez importante, 3 μ de diamètre environ, dont l'observation morphologique est aisée. Autotrophe pour l'azote, cette bactérie peut utiliser pour sa croissance diverses sources énergétiques organiques et se développer dans des milieux très pauvres, donc sélectifs. La souche a été sélectionnée à partir d'une terre de jardin ; elle est repiquée régulièrement sur gélose inclinée et cultivée à 28°C à l'obscurité. Les caractéristiques de la famille des *Azotobacteriaceae* ont été décrites par Jensen, [14].

Le milieu de culture liquide utilisé pour la croissance a la composition suivante :

— solution minérale de Winogradsky [11]	50 ml
— carbonate de calcium	2 g
— saccharose (ou benzoate de sodium)	5 g
— eau distillée q.s.p.	1000 ml

Les cultures liquides sont réalisées dans des fioles côniques de 150 ml contenant 100 ml de milieu, et après ensemencement, les fioles sont fixées sur une table à agitation rotative dans une chambre à incubation maintenue à la température de 28°C. Des prélèvements sont effectués à intervalles réguliers pour réaliser différents tests, parmi lesquels des numérations au microscope et des mesures turbidimétriques pour suivre la croissance.

B — Cinétique de croissance d'*Azotobacter chroococcum.*

Toute culture cellulaire en milieu liquide *in vitro* présente trois phases caractéristiques.

1 — *Phase de latence* : période pendant laquelle les cellules de l'inoculum nouvellement introduit ne se multiplient pas.

2 — *Phase de croissance exponentielle* : pendant cette phase les cellules se multiplient à intervalles de temps réguliers réalisant une progression logarithmique du nombre des individus de la population.

3 — *Phase stationnaire, ou de plateau* : lorsqu'en fin de croissance la multiplication cellulaire cesse et que le nombre des individus redevient de nouveau constant pendant un certain temps.

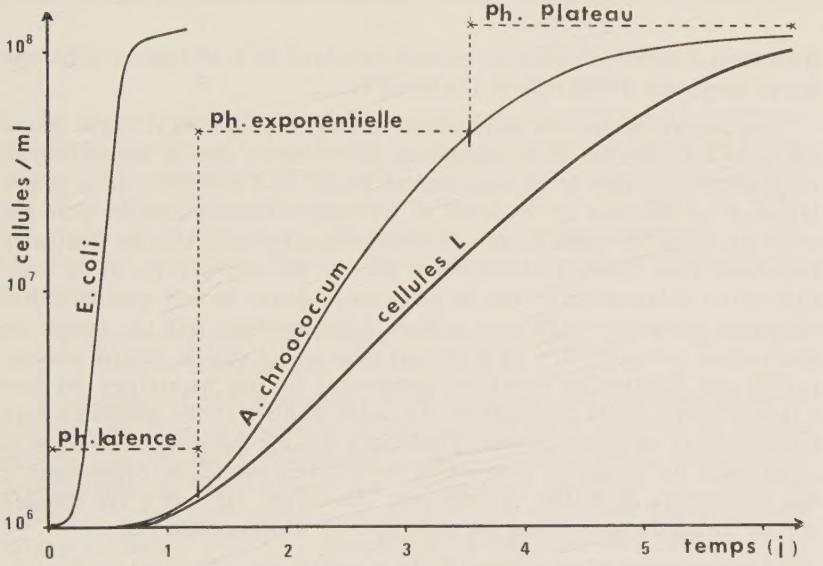


Fig. 1. — Courbe de croissance d'une culture d'*Azotobacter chroococcum*. Comparaison avec la croissance de fibroblastes de souris (cellules L) et de *Escherichia coli.*

Après inoculation de 10^6 cellules d'*Azotobacter*, la durée de la phase de latence de la nouvelle culture est de 12 à 18 heures avec une durée moyenne d'environ 14 heures (fig. 1).

Comme le fait remarquer Monod [21], le taux de croissance pendant cette période n'est pas toujours nul, il peut être « faiblement posi-

tif » et nous avons en effet constaté dans la majorité des cas qu'il y a une croissance très lente de la population pendant cette période et ceci dès le début de la culture. Il y a par conséquent, parmi les cellules de l'inoculum, des individus qui ne semblent pas avoir besoin d'un « conditionnement » ou d'une « adaptation » au milieu pour proliférer et qui ont donc des potentialités physiologiques ou génétiques particulières.

La phase de croissance logarithmique, qui fait suite à cette phase de latence, s'établit progressivement pendant une période transitoire

TABLEAU I.

Exp. n°	Inoculum cellules/ml	Phase de latence (h)	Phase (h) exponentielle	Croissance maximum c/ml
1	10^6	16	45	$128.\ 10^6$
2	—	13	40	$95.\ 10^6$
3	—	12	42	$102.\ 10^6$
4	—	14	47	$88.\ 10^6$
5	—	14	44	$91.\ 10^6$

d'environ 4 heures et persiste ensuite pendant 36 à 48 heures avec une durée moyenne de 40 heures (Tableau I).

Le temps moyen de génération des cellules pendant cette phase est de 12 à 15 heures. Il est important de souligner que ce temps moyen de génération reflète le comportement global de l'ensemble de la population et ne met pas en évidence le fait que certaines cellules peuvent avoir un temps de génération soit beaucoup plus long, soit au contraire beaucoup plus court. L'observation directe au microscope de la multiplication d'*Azotobacter* met en effet en évidence le fait que certaines bactéries prélevées dans une culture exponentielle ont un temps de génération qui peut être 10 à 15 fois plus court que le temps moyen, tandis que d'autres au contraire paraissent ne pas participer du tout à la croissance de la population. Il semble donc y avoir, même au sein d'une culture en phase exponentielle, une grande hétérogénéité dans la répartition du temps de génération de cellules soumises, cependant, à des conditions de milieu strictement identiques [18]. Il a été montré que ce temps de génération est génétiquement déterminé [15].

L'accroissement exponentiel du nombre des cellules pendant la phase exponentielle s'exprime par la formule :

$$N = N_0.e^{kt}$$

où N_0 est la concentration cellulaire de la culture à un instant t_0 au cours de cette phase, et N le nombre de cellules par unité de volume au temps t. La vitesse de croissance de la population est alors caractérisée par l'exposant (k). Cette *constante de croissance* (k) peut être déterminée à partir de la pente de la courbe de croissance tracée en coordon-

nées semi-logarithmiques, le logarithme du nombre de cellules étant porté en ordonnée et le temps de croissance en abscisse.

On a alors, à un instant donné :

$$\log N = \log N_0 + kt \cdot \frac{1}{2{,}303}$$

$$\text{Soit : } k = \frac{2{,}303}{t} \cdot \log \frac{N}{N_0}$$

Dans le cas d'*Azotobacter chroococcum*, pour un temps de génération moyen de 12 heures (43 200 secondes) la constante de croissance à la valeur suivante :

$$k = \frac{2{,}303}{43200} \log. 2 = 16.10^{-6} (s^{-1})$$

Constantes de croissance déterminées à partir de cultures différentes d'*Azotobacter chroococcum* en milieu au saccharose :

Expérience N°	Temps de latence (h)	k (s^{-1})
6	10,5	$18{,}5 . 10^{-6}$
7	16,2	$15{,}8 . 10^{-6}$
8	12,5	$16{,}2 . 10^{-6}$
9	18,1	$16{,}7 . 10^{-6}$

La croissance de la population commence à ralentir vers le 4e jour de culture liquide, en même temps qu'apparaît une pigmentation brune caractéristique de la souche, et vers le 5e jour ou le 6e jour la multiplication cesse. Les cellules demeurent viables à 100 % pendant un délai d'au moins 48 heures après cet arrêt de croissance avant que n'interviennent des processus liés à la toxicité du milieu et au vieillissement des cellules.

C — Enregistrement automatique des courbes de croissance ; erreurs inhérentes a la méthode.

Il est souvent nécessaire de suivre de façon continue l'évolution de la croissance d'une population cellulaire dans des conditions de milieu définies. Les appareils utilisés pour de telles expériences enregistrent automatiquement l'évolution des propriétés optiques de cultures liquides pendant leur croissance, en se basant sur le fait que la densité optique du milieu évolue en fonction du temps dans le même sens que la concentration cellulaire, en suivant de plus ou moins près la loi de Beer-Lambert [20]. Les courbes enregistrées par ces appareils (type Biophotomètre de Bonet-Maury et Jouan) présentent en général une allure sigmoïde semblable à celle des courbes de croissance de populations cellulaires obtenues par numérations, avec trois parties caractéristiques figurant la phase de latence, la phase exponentielle et la phase stationnaire.

Cependant, des « phases de latence » et des « phases stationnaires » peuvent être enregistrées par ces appareils à partir de cultures

liquides qui sont effectivement en phase de croissance exponentielle pendant toute la durée d'une expérience. Ayant vérifié par des numérations cellulaires associées à des mesures de densité optique que les propriétés optiques de la suspension suivent avec précision la loi de BEER (densité optique proportionnelle à la concentration cellulaire), et ayant ainsi éliminé la critique fondamentale que l'on attribue à ces mesures turbidimétriques auxquelles on reproche souvent leur manque de précision, nous avons été amené à remettre en cause l'interprétation des courbes obtenues en reconsidérant le principe de fonctionnement de ces appareils [9].

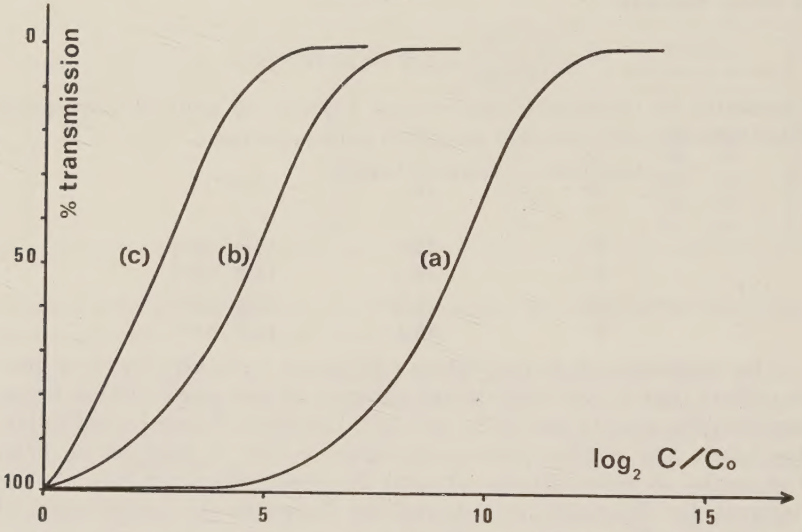


FIG. 2. — Courbes du pourcentage de transmission de milieux absorbants dont la densité optique augmente exponentiellement. (a), (b), (c) : voir texte.

Principe du biophotomètre enregistreur.

Comme tout photomètre, le Biophotomètre de BONET-MAURY et JOUAN, dont il s'agit ici, mesure la variation d'intensité lumineuse d'un faisceau traversant un milieu absorbant, celui-ci étant une suspension cellulaire. Si les propriétés optiques de la suspension sont conformes à la loi de BEER, la variation d'intensité lumineuse d'un faisceau mono-

TABLEAU II.

C	$D_o = (k)\ C$	$Log_{10} I = 2\text{-}D_o$	I	$Log_2 \frac{C}{C_o}$
$C_o = 1$	0	2	100	0
$C_1 = 2$	$1\ 10^{-3}$	1,999	99,99	1
$C_2 = 4$	2 —	1,998	99,54	2
$C_3 = 8$	4 —	1,996	99,09	3
$C_4 = 16$	8 —	1,992	98,18	4

chromatique traversant une épaisseur l de suspension est exponentielle. Si I_o est l'intensité incidente, I l'intensité après traversée et C la concentration du corps absorbant, on a la relation :

$$\log_{10} \frac{I_o}{I} = e.l.C = Do$$

où Do est la densité optique du milieu et e le coefficient d'extinction spécifique du corps absorbant. Le rapport $\frac{I}{I_o}$ représente la transmission du milieu. Enfin e et l étant constants dans une expérience donnée, Do est directement proportionnelle à la concentration du corps absorbant :

$$Do = (k).C$$

Suivant le principe du Biophotomètre, on règle l'intensité de la source lumineuse en début d'expérience, de telle sorte que l'intensité transmise par la suspension cellulaire initiale corresponde à 100 % ($I_o = 100$) et au cours de la croissance de la population l'appareil enregistre l'évolution de l'intensité transmise I exprimée directement en pourcentage. On a dans ce cas :

$$\log_{10} \frac{100}{I} = Do = 2 - \log_{10} I$$

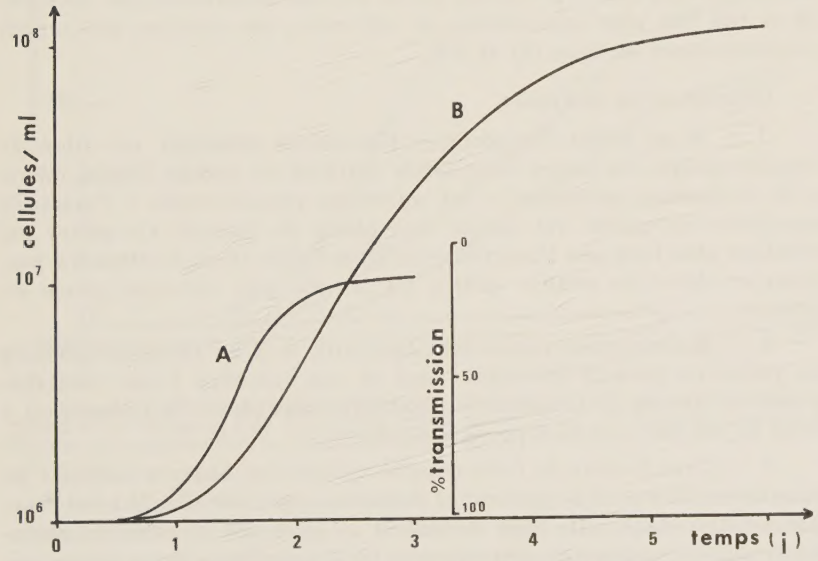


Fig. 3. — Courbe de croissance d'*Azotobacter* obtenue au Biophotomètre (A) et courbe de croissance réelle (B).

Supposons donc que l'on étudie de façon théorique l'évolution de l'intensité transmise I d'une suspension dont les propriétés optiques sont conformes par définition à la loi de Beer, et dont la concentration en particules absorbantes double à intervalles réguliers de la concentration initiale Co (100 % de transmission) aux concentrations succes-

sives $C_1 = 2\ C_o$, $C_2 = 2\ C_1$... réalisant ainsi une « croissance » exponentielle. Supposons par ailleurs que la densité optique de la suspension C_1 soit 1×10^{-3}. Dans ces conditions, on peut établir les données du tableau 2 et tracer la courbe I % en fonction du doublement régulier de la concentration ($\log_2 \frac{C}{C_o}$). On obtient ainsi la courbe (a) (fig. 2).

Un raisonnement théorique analogue appliqué à des concentrations C_o, 25 et 100 fois supérieures (D_o des suspensions C_1 correspondantes : 25×10^{-3} et 100×10^{-3}) permet d'obtenir les courbes (b) et (c) (fig. 2).

On constate que ces courbes théoriques représentent différentes formes de courbes de croissance cellulaire. Les phases de « latence » et « stationnaires » qui figurent sur ces courbes sont fictives puisque la concentration de particules absorbantes évolue exponentiellement par définition.

Si, à la place de ces données purement théoriques, on réalise en tube à essai une série de dilutions de 2 en 2 à partir d'une suspension bactérienne très dense, afin de réaliser une gamme exponentielle et si l'on prend comme témoin 100 % une suspension diluée de concentration $C_o \simeq 0{,}5 \times 10^6$ cellules/ml, la densité optique des concentrations $C_1 = 2\ C_o$, $C_2 = 2\ C_1$,... successives sera telle que l'on obtiendra une courbe du type (a). Si le témoin 100 % est une suspension par exemple 25 et 100 fois plus concentrée, on obtiendra des courbes qui seront respectivement du type (b) et (c).

Conséquences pratiques.

1 — Si en début d'expérience l'inoculum cellulaire est dilué, la densité optique du milieu reste faible pendant un certain temps, même si la croissance cellulaire y est purement exponentielle : l'appareil enregistre un palier qui simule une phase de latence. Ce palier est d'autant plus long que l'inoculum est plus faible et on l'obtiendra toujours en début de culture qu'il y ait ou non une véritable phase de latence.

2 — Si l'inoculum initial est important, et si on enregistre encore un palier on pourra seulement dans ce cas conclure à une véritable phase de latence. Si la culture se multiplie sans phase de latence, on a dans ce cas une courbe à pente ascendante.

3 — Dans la zone de forte densité optique, on observe toujours un épaulement même si la croissance demeure exponentielle. Il n'est donc pas possible dans cette zone de mettre en évidence un éventuel ralentissement de croissance correspondant à l'apparition de la phase stationnaire.

En conclusion : il faut souligner le fait que la forme sigmoïde des courbes de croissance obtenues au Biophotomètre enregistreur peut être sans rapport avec l'état dynamique réel de la population étudiée et des numérations de contrôle sont indispensables afin de déterminer si les phases de « latence » et « stationnaire » enregistrées correspondent ou non à la réalité (fig. 3).

A la suite de ces observations nous avons été obligés d'abandonner cette méthode automatique au profit de mesures manuelles.

D — Effets de la MIH sur la croissance.

Comme les radiations ionisantes, la MIH provoque la mort cellulaire par blocage des mitoses dans une partie de la population. Ainsi, certaines cellules privées de leur faculté de multiplication ne participent plus à la prolifération de l'ensemble et entraînent des modifications de la cinétique de croissance. Ce sont ces modifications qui sont étudiées ici au niveau de la population.

1 — *MIH et phase de latence.*

A partir d'une culture en phase exponentielle de 48 à 72 heures, on inocule une série de fioles de 150 ml contenant 100 ml de milieu de

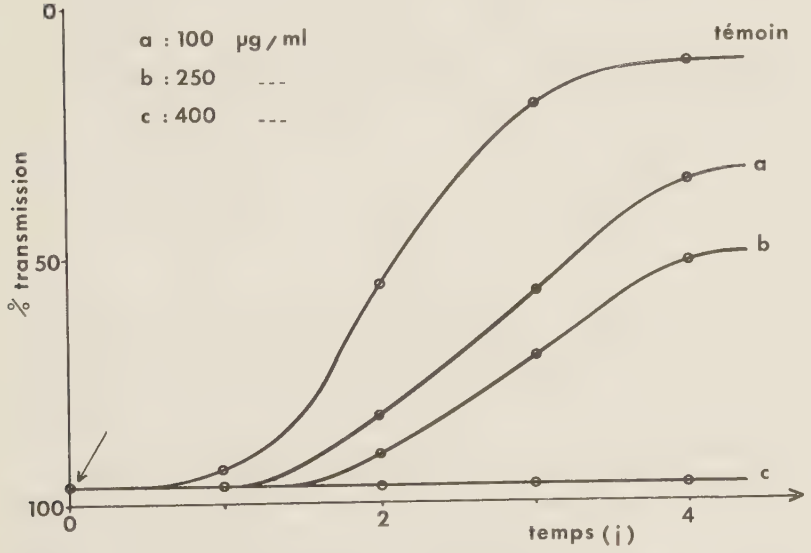


Fig. 4. — Croissance d'*Azotobacter chroococcum* en présence de MIH. Le rythme de croissance de l'ensemble de la population est diminué lorsque la drogue est ajoutée dès le début de la culture (——➤).

culture. La concentration cellulaire initiale est de 10^6 cellules par millilitre de culture. Une solution fraîche de MIH est préparée et stérilisée par filtration sur millipore (0,22 µ) et des aliquots sont introduits, aussitôt après l'inoculation des fioles, de telle sorte que l'on ait une gamme de concentrations comprises entre 100 et 400 µg/ml. Des fioles sans drogue servent de cultures témoins. Les fioles sont placées sur une table à agitation dans une étuve à 28°C, et la croissance ultérieure des cultures est suivie par enregistrement quotidien de la densité optique à 600 nm (la présence de drogue n'interfère pas sur la D_o à cette longueur

d'onde). Les résultats présentés sur la figure 4 et le tableau 3 sont la moyenne de 8 expériences identiques [10].

TABLEAU III.

MIH µg/ml	Densité optique des cultures en fonction dn temps de croissance (jours) (± 2 σ)				
	0	1	2	3	4
0	0,013 ± 0,004	0,036 ± 0,005	0,220 ± 0,12	0,900 ± 0,16	1,301 ± 0,20
100	0,013 —	0,013 ± 0,004	0,086 ± 0,06	0,267 ± 0,05	0,523 ± 0,10
250	0,013 —	0,013 —	0,050 ± 0,005	0,167 ± 0,005	0,319 ± 0,06
400	0,013 —	0,013 —	0,013 ± 0,004	0,013 ± 0,004	0,013 ± 0,004

Ces résultats mettent en évidence le fait que l'adjonction de MIH à une culture nouvellement ensemencée prolonge la durée de la phase de latence de façon plus ou moins intense suivant la dose de drogue utilisée. La croissance peut même être totalement inhibée pour des doses supérieures ou égales à 400 µg/ml.

Dose de MIH µg/ml	Phase de latence (h)	Temps de doublement TD (h)
0	12	12
100	14	15
250	17	22
400	∞	∞

Compte tenu des effets cytotoxiques connus de la drogue, la croissance d'une fraction importante de la population doit être inhibée par dégradation du DNA bactérien et l'inoculum « efficace » de la population se trouve réduit d'autant, ceci ayant pour effet de prolonger la phase de latence.

Il est possible également que l'action de la drogue au niveau intracellulaire se traduise par un ralentissement du métabolisme puisqu'on sait en effet que la MIH a un effet inhibiteur sur le métabolisme énergétique des cellules de mammifères.

2 — *Constante d'inhibition spécifique.*

Les cultures, qui malgré la présence de drogue poursuivent leur croissance, ont une phase exponentielle ralentie par rapport à celle des cultures témoins et leur taux de croissance est d'autant plus faible que la dose de drogue au contact des cellules est plus importante. On note, par ailleurs, que la croissance maximum finale est également affectée par la MIH dans la mesure où la phase de plateau des cultures test apparaît peu de temps après celle des témoins, ne permettant pas aux cultures inhibées de poursuivre plus avant leur croissance pour atteindre éventuellement la concentration cellulaire des cultures témoins.

On peut considérer que la drogue exerce sur la population en croissance une certaine inhibition qui est spécifique du produit et fonc-

tion de la dose inhibitrice. Pour une dose donnée, la constante de croissance de la courbe exponentielle atténuée pourrait s'exprimer suivant la relation de Garrett [8] :

$$k = k_o - k_i (I)$$

k étant la constante de croissance mesurée sur la courbe,
k_o étant celle des milieux témoins en l'absence de drogue,
et k_i étant la constante d'inhibition spécifique de la drogue de concentration (I).

La constante d'inhibition spécifique se déduit des autres paramètres k, k_o et I donnés par l'expérience.

$$k_i = (k_o - k) \frac{1}{I}$$

Le tableau 4 rend compte des valeurs moyennes de k_i déterminées pour différentes concentrations de drogue ; celles-ci sont voisines de 3.10^{-8} ml/µg/s.

3 — *MIH et phase exponentielle.*

Si on ajoute la MIH dans des cultures qui sont en phase de croissance exponentielle, on observe une résistance pratiquement totale de la

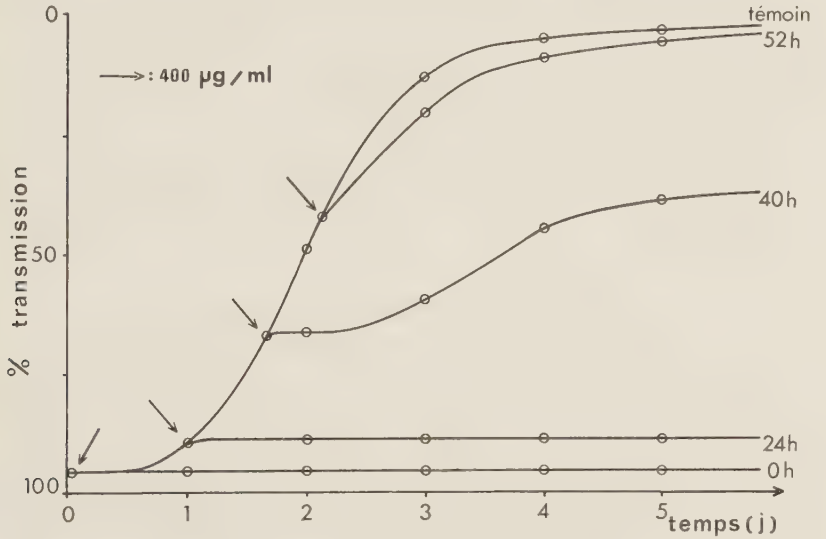


Fig. 5. — Effets de la MIH sur la croissance d'*Azotobacter chroococcum*. Le produit est ajouté dans des cultures différentes aux temps 0, 24, 40 et 52 heures après le début de l'expérience (⟶).

population qui poursuit sa croissance, même pour les doses les plus fortes (400 µg/ml). Cette résistance à la drogue évolue de façon continue du début à la fin de la croissance et si on ajoute la MIH à intervalles réguliers au cours de la croissance dans des séries parallèles de cultures, on constate que les modifications cinétiques qu'elle entraîne sont d'autant plus faibles que le stade de croissance est plus avancé (fig. 5).

En particulier, lorsque la MIH est ajoutée après 3 jours de croissance on met en évidence une biodégradation de la drogue, celle-ci étant utilisée par les bactéries pour la synthèse d'un pigment jaune fluorescent qui n'existe pas dans les cultures témoins. Cette biodégradation n'a pas lieu en début de culture et peut expliquer le processus de résistance observé ensuite.

4 — *MIH et synthèse du DNA, du RNA et des protéines.*

Des expériences d'incorporation isotopique ont été réalisées sur des cultures témoins et des cultures traitées à la MIH dans le but d'étudier les effets de la drogue sur l'incorporation de précurseurs du DNA, du RNA et des protéines par les cellules. Les points suivants ont pu être ainsi précisés :

a) Pendant les 24 premières heures qui suivent l'inoculation des cultures en présence de 350 µg/ml de MIH, il n'y a aucune incorporation de Thymidine-^{3}H, alors que celle-ci débute vers la 12^{e} heure dans les cultures témoins. La prolongation de la phase de latence par la MIH correspond donc à un blocage temporaire de la synthèse du DNA dans toutes les cellules.

b) La croissance en présence de MIH s'accompagne d'une incorporation préférentielle de la Thymidine ^{3}H préformée par rapport à la Thymidine néoformée par les cellules. Il y a inhibition partielle de la chaine de biosynthèse interne de Thymidine.

c) Pendant les 24 premières heures, la synthèse du RNA n'est que faiblement ralentie par la MIH (uridine-^{14}C).

d) Dans un milieu cellulaire non proliférant la synthèse protéique est inhibée de 59 % par rapport aux témoins, avec une dose de MIH de 350 µg/ml.

IV — Survie d'*Azotobacter chroococcum* soumis à l'action des rayons γ du ^{60}Co et à la MIH.

Le passage de la sensibilité à la résistance au niveau de la population correspond-il a une évolution régulière des propriétés individuelles des cellules vers une plus grande résistance au cours de la croissance, où est-il le résultat de propriétés liées à la concentration cellulaire ? En d'autres termes, est-ce que des cellules individuellement sensibles à un agent toxique, peuvent exprimer un caractère de résistance lorsqu'elles sont étroitement associées ? Les expériences de survie que nous avons réalisées donnent à ce sujet des éléments de réponse.

1. — Survie aux rayons γ et a la MIH.

Ayant à notre disposition une source de radiations γ, quelques expériences ont été réalisées en parallèle avec la MIH, compte tenu de ses propriétés radiomimétiques. En bref, l'expérimentation consiste à exposer un nombre connu de cellules à des doses croissantes d'agent cytotoxique, puis à mesurer le nombre des cellules survivantes. La

représentation graphique de ce nombre en fonction de la dose correspond à la courbe de survie. Techniquement, on isole sur milieu gélosé en boite de Pétri une fraction des cellules traitées par l'agent cytotoxique, et après incubation des boites à l'étuve à 28°C, les cellules qui

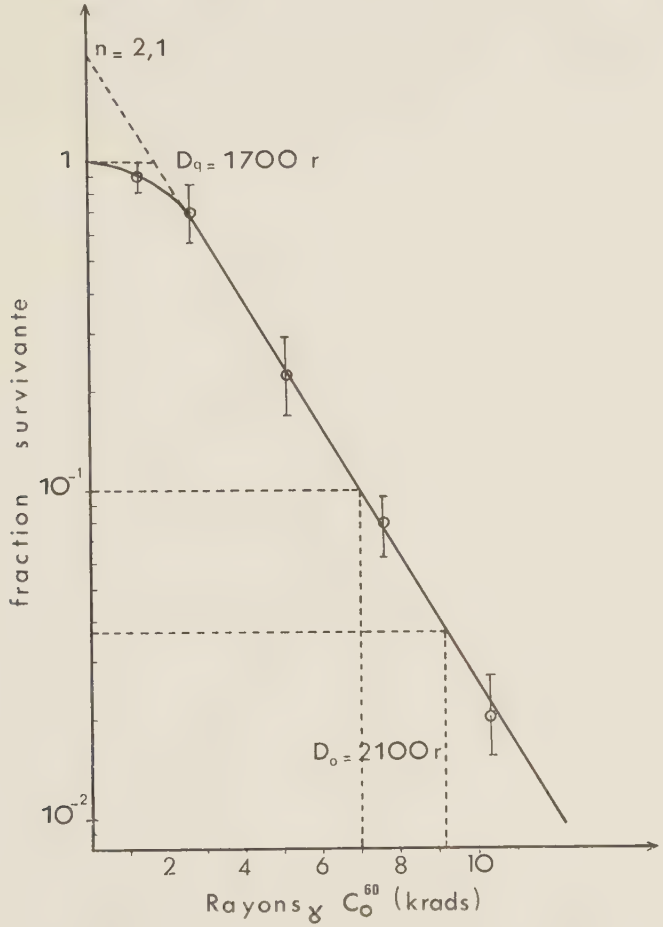


Fig. 6. — Courbe de survie d'*A. chroococcum* aux radiations γ. Cellules provenant d'une culture en phase exponentielle.

ont survécu donnent naissance à des colonies dont le nombre est fonction de la dose reçue [11]. La courbe de survie d'*Azotobacter* aux rayons γ est représentée sur la figure 6. A partir de cette courbe, on définit trois paramètres :

— *La dose seuil : Dq = 1700 rads.*

L'épaulement initial de la courbe montre qu'il y a une dose théorique en dessous de laquelle les cellules ne sont pas tuées, soit parce qu'elles n'ont pas été touchées par les radiations, soit parce qu'elles

sont susceptibles de résister à une certaine dose : on sait maintenant que cette résistance correspond à des processus enzymatiques de restauration des lésions [23].

La dose létale moyenne : Do = 2100 rads.

Au delà de la dose seuil, les capacités de restauration enzymatiques sont dépassées et les cellules sont tuées proportionnellement à la dose. Par définition la dose Do, est la dose qui réduit à 37 % le nombre des cellules survivantes, dans la partie exponentielle de la courbe. Elle définit la pente de la courbe, donc la sensibilité des cellules.

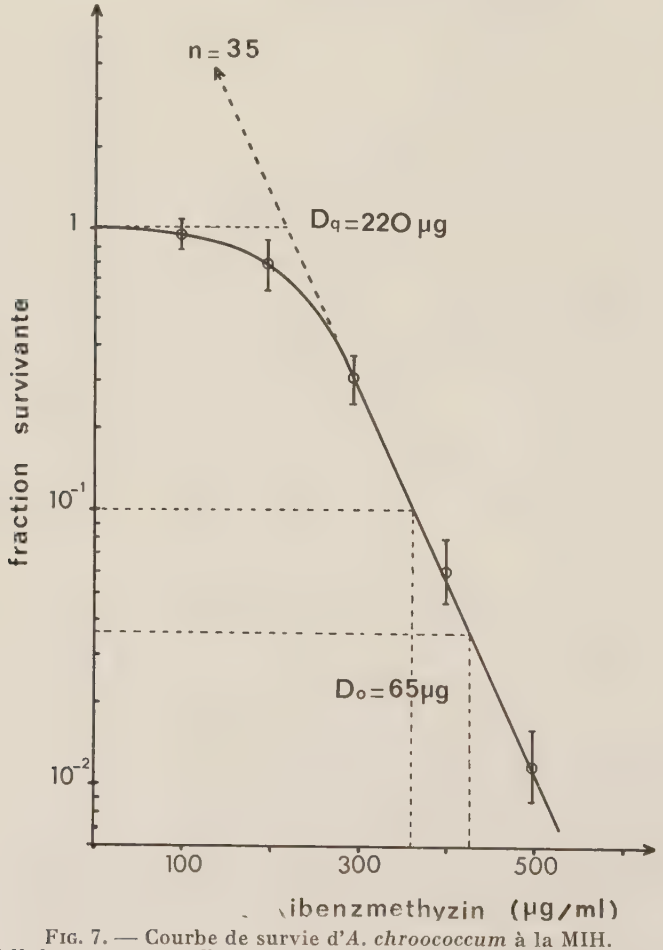


Fig. 7. — Courbe de survie d'*A. chroococcum* à la MIH.
Cellules provenant d'une culture en fin de phase exponentielle.

— *Le nombre d'extrapolation : n = 2,1.*

On l'obtient en prolongeant à l'origine la partie exponentielle de la courbe. Il est en général d'autant plus élevé que les cellules sont plus

résistantes. D'un point de vue purement radiobiologique, la résistance d'*Azotobacter* aux radiations est environ 10 fois supérieure à celle des cellules de métazoaires dont la Do est voisine de 150 rads. Cette résistance est cependant comparable à celle d'autres bactéries.

La figure 7 représente la courbe de survie d'*Azotobacter* à la MIH. Cette courbe est obtenue en étalant directement des cellules sur milieu

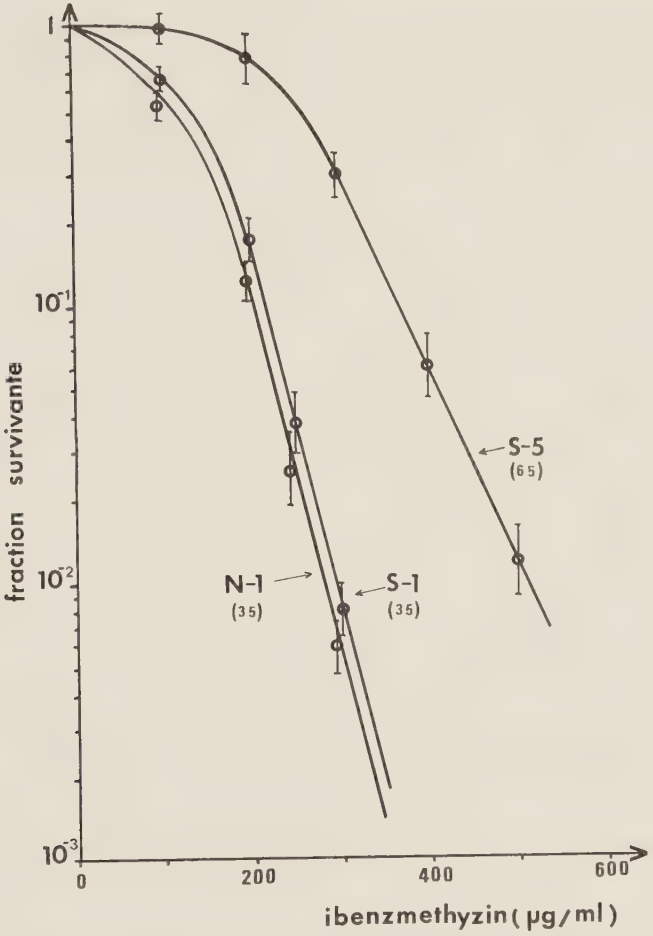


Fig. 8. — Courbes de survie d'*A. chroococcum* à la MIH. S1 = cellules d'une culture de 48 heures. S5 = cellules d'une culture de 5 jours. N1 = cellules de 48 heures ayant proliféré en présence de MIH. La Do de chaque courbe est indiquée entre parenthèses.

gélosé dans lequel est incorporée la MIH à des doses croissantes. On obtient une courbe de même allure que la précédente, avec les paramètres suivants :

Dq = 220 µg
Do = 65 µg
n = 35

Les valeurs particulièrement élevées de n et Do soulignent ici le caractère particulier de résistance des cellules pour cette drogue.

2. — Survie et stade de croissance.

La plupart des expérimentations faites *in vitro* sur des populations cellulaires concernent des cellules en phase de croissance exponentielle, mais en fait, pendant cette phase, une partie seulement des propriétés cellulaires sont exprimées. En ce qui concerne la sensibilité des cellules à la MIH les courbes de survies obtenues avec des cultures en début de croissance ou en fin de croissance sont très différentes (fig. 8) et l'étude de la sensibilité individuelle des cellules à une dose

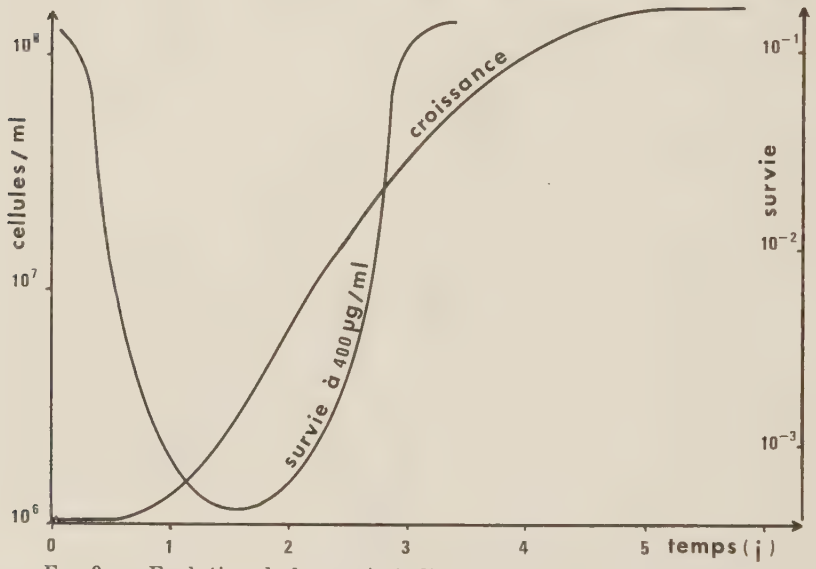


Fig. 9 .— Evolution de la survie individuelle des cellules en fonction du stade de croissance de la population. Les cellules ont un maximum de sensibilité à la MIH pendant la phase exponentielle.

donnée de drogue montre qu'il y a une évolution continue des propriétés cellulaires pendant toute la durée de la croissance (fig. 9). En particulier il faut noter que les cellules présentent un maximum de

TABLEAU IV.

MIH (µg/ml)	k_o (s^{-1})	k (s^{-1})	TD (s)	$k_o - k_i'$ (s^{-1})	k_i ($ml.s^{-1}.ug^{-1}$)
0	16.10^{-6}	—	43 200	—	—
100	—	$12,8 . 10^{-6}$	54 000	$3,2 . 10^{-6}$	$3,2 . 10^{-8}$
250	—	$8,7 . 10^{-6}$	79 200	$4,7 . 10^{-6}$	$2,9 . 10^{-8}$
350	—	$6 . 10^{-6}$	115 200	$10 . 10^{-6}$	$2,8 . 10^{-8}$
400	—	—	—	—	—

sensibilité individuelle à la drogue lorsqu'elles sont prélevées en phase exponentielle, or, on a vu qu'au niveau de la population cette phase est résistante à la drogue : ceci souligne le rôle important que peuvent jouer les interactions cellulaires qui sont susceptibles de modifier les propriétés individuelles des cellules [2].

3 — Survie et densité cellulaire.

Par la méthode de clonage sur milieu gélosé, on a étudié les variations du nombre de cellules survivantes en fonction du nombre total de cellules étalées, afin de déterminer si le rapprochement des cellules joue un rôle sur la survie. Il y a effectivement une action très nette de la concentration cellulaire sur la survie, celle-ci étant meilleure, là où la concentration cellulaire dépasse 500 à 700 cellules par boite. Il y a

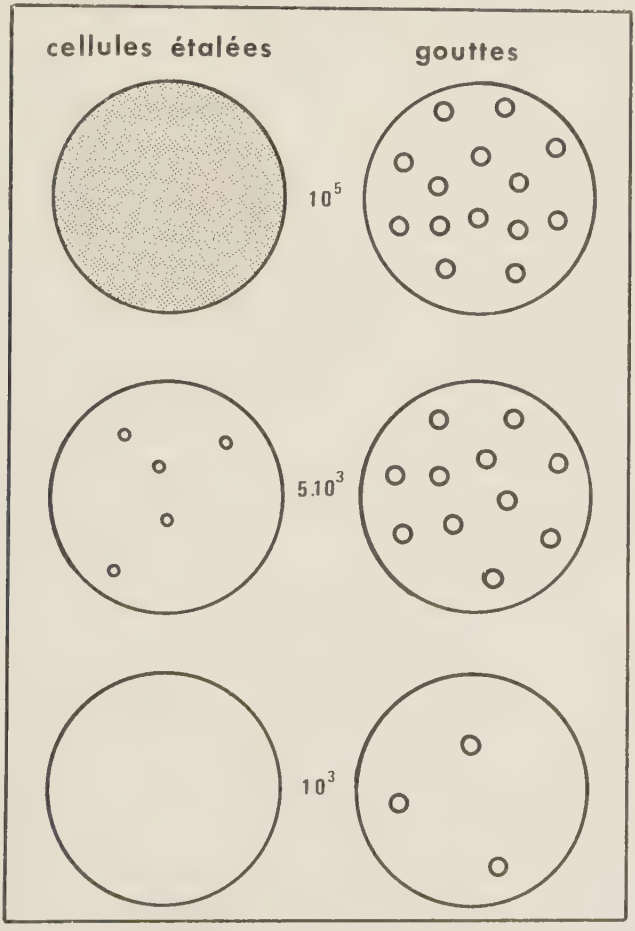


Fig. 10. — Expérience de Harris ; influence de la concentration cellulaire sur l'expression de la résistance à la MIH.

une distance entre les cellules au delà de laquelle cet effet stimulant ne s'exerce plus. Cet effet biologique est général, il a été étudié en particulier par Harris [12] sur des cellules de rein de porc en culture, en utilisant une technique particulière, reprise ici : dans deux séries de boites de Pétri contenant du milieu gélosé et une dose inhibitrice de MIH (400 µg/ml), on répartit 10^5, 5.10^3 et 10^3 cellules d'une part étalées uniformément et d'autre part disposées en 14 gouttes par boite. Après séjour à l'étuve pendant 48 heures on constate que les cellules étalées uniformément sont très rapidement tuées par la drogue, tandis que les paquets de cellules résistent. Pour 5.10^3 cellules étalées, il y a 5 survivants, tandis qu'on dénombre 11 grosses colonies sur 14 ; pour 10^3 cellules étalées il n'y a pas de survivants et on compte encore 3 grosses colonies. Ces expériences parfaitement reproductibles, soulignent le fait que des cellules létalement lésées peuvent s'entraider mutuellement et survivre si elles sont suffisamment proches les unes des autres pour que puissent s'effectuer des échanges intercellulaires.

V — Interactions cellulaires et croissance des populations.

Les expériences précédentes soulignent, à notre avis, un point tout à fait fondamental en biologie, dans la mesure où elles mettent en évidence que les cellules biologiquement « estropiées » peuvent dans certaines conditions se comporter comme des cellules normales, au potentiel génétique intact. Ce qui a été mis en évidence à propos de la MIH, l'a été également à propos des radiations, et tout concorde pour affirmer que les cellules qui ne peuvent plus proliférer sont atteintes dans leur patrimoine génétique. Comme cette atteinte se fait au hasard, une population irradiée ou traitée par la MIH est caractérisée par une forte micro-hétérogénéité génétique : des cellules lésées en des sites différents peuvent s'entraider par un véritable processus de complémentarité, l'une étant susceptible de fournir à l'autre les protéines qu'elle ne peut plus synthétiser. En d'autres termes, deux cellules qui expriment dans un milieu donné des propriétés physiologiques identiques peuvent différer génétiquement par un certain nombre de micro-mutations ponctuelles.

Ainsi, les interactions cellulaires ont pour conséquence de masquer l'hétérogénéité individuelle des cellules en favorisant leur croissance.

L'action de ces interactions est particulièrement nette ici dans le cas de la MIH, puisque la résistance des cellules à la drogue est liée de façon très importante à la concentration cellulaire : des cellules en phase de croissance exponentielle étant particulièrement sensibles à la drogue quand elles sont isolées et au contraire résistantes lorsqu'elles sont groupées en population.

Le même processus a été observé avec les radiations ionisantes, sur des bactéries et sur des cellules de métazoaires.

Enfin, il est possible qu'en l'absence de tout agent cytotoxique existe au sein d'une population clônale une grande micro-hétérogénéité

non détectable physiologiquement : il faut se rappeler en effet que la sélection d'un mutant biochimique dans une population, avec un taux de mutation de l'ordre de 10^{-5} à 10^{-7} dans un site génétique donné, ne donne pas d'indications sur le nombre de mutations ponctuelles qui se sont produites par ailleurs et qui n'ont pas eues d'incidences physiologiques.

Si l'on se rappelle (a) que des triplets différents peuvent coder un même acide aminé, [27]

GUU, GUC, GUA, GUG } Valine — CGU, CGA, CGG } Arginine

(b) qu'un même triplet peut coder des acides aminés différents, (c) qu'un RNA de transfert peut se tromper d'acide aminé [6] (par ex. t-RNA-Valine peut charger l'Isoleucine), (d) qu'il existe des systèmes enzymatiques intracellulaires capables de réparer les erreurs au niveau du DNA, (e) qu'une enzyme peut être très largement « amputée » en dehors de son site actif, sans porter atteinte à son activité catalytique qui est souvent le critère détecté, on conçoit alors que l'hypothèse d'un haut taux de mutations nucléotidique puisse être invoquée [16, 17].

BIBLIOGRAPHIE.

1. Berneis K., Kofler M., Bollag W., Kaiser A., Langemann A., 1963. — The degradation of deoxyribonucleic acid by new tumor inhibiting compounds : The intermediate formation of hydrogen peroxyde. *Experientia*, **19**, 132.
2. Boige F., Abbatucci J. S., Kauffmann J., Goussard J., 1970. — Rôle de l'état physiologique et de la concentration cellulaire sur la survie d'*Azotobacter chroococcum* aux rayons γ et à l'ibenzmethyzine. *C. R. Soc. Biol.*, **164**, 11, 2229.
3. Bollag W., Grunberg E., 1963. — Tumor inhibitory effects of a new class of cytotoxic agents : methylhydrazine derivatives. *Experientia*, **19**, 130.
4. Broookes P., 1965. — Studies on the mode of action of ibenzmethyzin. Dans « Natulan ». Jelliffe A. M. et Marks eds., Wright and sons, Bristol, p. 9.
5. Chaube S., Murphy M. L., 1964. — The teratogenic effects of 1-methyl -2p-(isopropylcabamoyl)-benzylhidrazine. *Proc. Amer. Ass. Cancer Res.*, **5**, 11.
6. Davies J., 1969. — Errors in translation. Dans « Progress in molecular and subcellular biology ». Vol. *1*, Hahn F. F. ed., Springer Verlag, Berlin, p. 47.
7. Fusenig N. E., Obrecht P., Strickstrock K. H., 1966. — Zur Biochemie der sog. cytostatischen Nebenwirkungen Vergleichende Untersuchungen. *Klin. Wschr.*, **44**, 23, 1335.
8. Garret E. R., Wright O. K., Miller G. H., Smith K. L., 1966. — Quantification and prediction of the biological activities of chloramphenicol analogs by microbial kinetics. *J. Med. Chem. U.S.A.*, **9**, 2, 203.
9. Goussard J., 1970. — Signification des phases de croissance d'une population cellulaire, obtenues par turbidimétrie. *C. R. Soc. Biol.*, **164**, 4, 760.
10. Goussard J., Kauffmann J., 1970. — Effets de l'inbenzmethyzin (MIH) sur la cinétique de croissance d'*Azotobacter chroococcum*. *C. R. Soc. Biol.*, **164**, 11, 22-26.

11. Goussard J., Boige F., Kauffmann J., Abbatucci J. S., 1970. — Cinétique de survie d'*Azotobacter chroococcum* soumis à l'action des rayons γ du ^{60}Co et d'un agent radiométrique. *C. R. Soc. Biol.*, **164**, 4, 764.
12. Harris M., 1967. — Phenotypic expression of drug resistance in cell cultures. *J. Nat. Cancer Inst.*, **38**, 2, 185.
13. Jelliffe A. M., Marks J., 1965. — Natulan (ibenzmethyzin). J. Wright and Sons, Bristol.
14. Jensen J. L., 1954. — The *Azotobacteriaceae. Bacteriological Rev.*, **18**, 1, 195.
15. Kauffmann J., 1966. — Nouvelle conception évolutive sur la stabilité de l'espèce. Induction et répression chez les bactéries. *Editions du Drakkar*, Caen.
16. Kauffmann J., 1967. — Induction, répression et variations antigéniques chez les bactéries. Arguments en faveur de la non existence des gènes régulateur et opérateur. *Rev. Immunologie*, **31**, 1-2, 45.
17. Kauffmann J., 1968. — Gene regulation in bacteria — A new conception of the operon. *Currents in Modern biology*, **2**, 189.
18. Kauffmann J., 1971. — Sur les fluctuations du temps de génération d'*Azotobacter*. Communication personnelle.
19. Koblet H., Diggelmann H., 1968. — Action of ibenzmethyzin on protein sythesis in the rat liver. *Europ. J. Cancer*, **4**, 45.
20. Loiseleur J., 1963. — Technqiues de Laboratoire. *Masson ed. Paris.*
21. Monod J., 1942. — Recherches sur la croissance des cultures bactériennes. Thèse, Hermann ed., Paris.
22. Oliverio V. T., Kelly M. G., 1964. — Contribution to the biological and clinical effect of a methylhydrazine derivative. Dans « Chemotherapy of Cancer ». Plattner Pl. ed., Elsevier, Amsterdam.
23. Orr J. S., Hope C. S., Wakerley S. E., 1966. — A metabolic theory of cell survival curves. *Phys. Med. biol.*, **11**, 1, 103.
24. Rutishauser A., Bollag W., 1967. — Untersuchungen uber den Wirkungsmechanismus von procarbazin. *Experientia*, **23**, 222.
25. Vita V. T. de, Hahn M. A., Oliverio V. T., 1965. — Monoamine oxydase inhibition by a new carcinostatic agent (MIH). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **120**, 561.
26. Weitzel G., Schneider F., Kummer D., Ochs J., 1968. — Cytostatischer Wirkungsmechanismus von natulan. *Z. Krebsforschung*, **70**, 354.
27. Woese C. R., 1969. — The biological significance of the genetic code. Dans « Progress in molecular and subcellular biology, vol. **1**, Hahn F. E. ed., Springer Verlag, Berlin, p. 5.
28. Zeller P., Guttmann H., Hegedus B., Kaiser A., Langemann A., Müller M., 1963. — Methylhydrazine derivatives, a new class of cytotoxic agents. Experientia, **19**, 129.